



УДК 615.779.931;577.1;547.96

АМИНОКИСЛОТНЫЕ АНАЛОГИ ХЛОРАМФЕНИКОЛА —
ИНГИБИТОРЫ ПЕПТИДИЛТРАНСФЕРАЗНОЙ РЕАКЦИИ
В РИБСОМАХ *E. coli* *

Ервевский А. А., Николаева Л. В., Куханова М. К.,
Гнучев Н. В., Готтих Б. П.

Институт молекулярной биологии Академии наук СССР, Москва

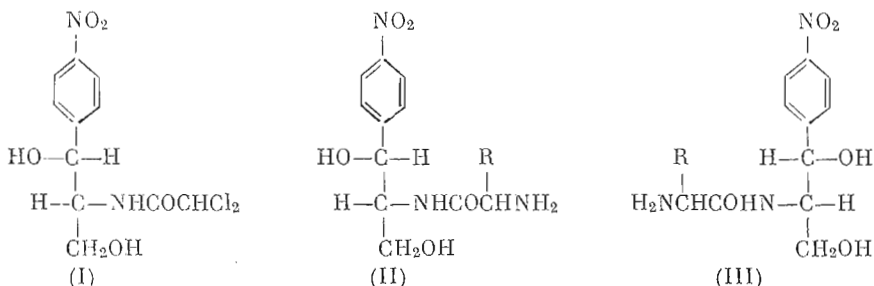
Исследовано ингибирующее действие аминокислотных аналогов хлорамфеникола на образование пептидных связей пептидилтрансферазой рибосом *E. coli* MRE-600. Использовали бесклеточную систему с AcPhe-тРНК в качестве донора и с пурамицином как акцептором. Показано, что глициновый и *L*-фенилаланиновый амиды *D*-(-)-трео-1-(*n*-нитрофенил)-2-аминопропандиол-1,3 подобно хлорамфениколу ингибировали перенос AcPhe-остатка на пурамицин, тогда как аналогичные амиды *L*-(+)-треорядя ингибирующим эффектом практически не обладали. Однако ни одно из изученных соединений в различных условиях (при разных концентрациях ионов K^+ с добавлением этанола, мочевины, при диссоциации рибосомальных субъединиц после опыта) не акцептировало пептид.

Известно, что антибиотик хлорамфеникол [*D*-(-)-трео-1-(*n*-нитрофенил)-2-дихлорацетиламидпропандиол-1,3, (I)] ингибирует биосинтез белка у бактерий на рибосомальном этапе [1]. Можно считать твердо установленным, что молекула хлорамфеникола связывается акцепторным участком ПТЦ рибосомы (либо вблизи этого участка) в соотношении одна молекула антибиотика на одну рибосому и тем самым препятствует фиксации акцепторного конца аминоацил-тРНК. Хлорамфеникол конкурентно ингибирует связывание аминокислотных эфиров тринуклеозиддифосфата СрСрА (СрСрА-Phe, СрСрА-LyS, СрСрА-Ser, СрСрА-Leu и др.), являющихся акцепторами пептида в рибосомах *E. coli*, с аминокислотным участком ПТЦ [2]. С антибиотиком пурамицином, моделирующим акцепторный участок аминоацил-тРНК, хлорамфеникол также находится в конкурентных отношениях [2]. Показано, что при ковалентном присоединении бром-аналога хлорамфеникола, а также *N*-йодацетилпурамицина к рибосомам *E. coli* оба антибиотика оказываются введенными в один и тот же белок [3], L-16 [4, 5], который находится в 50S-субъединице. В то же время известно, что белок L-16 не ответствен за связывание пептидил-тРНК по донорному участку ПТЦ и за трансферазную реакцию [6]. Все это говорит в пользу гипотезы, сформулированной ранее [7, 8], в соответствии с которой хлорамфеникол занимает в ПТЦ рибосомы участок, предназначенный для связывания акцепторного конца аминоацил-тРНК.

По этой гипотезе предполагалось, что если бы молекула хлорамфеникола имела группу, способную акцептировать пептид (NH_2 -группу), то можно было бы ожидать образования пептидной связи, т. е. катализи-

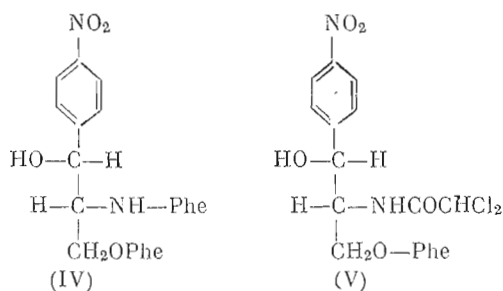
* Сокращения: ПТЦ — пептидилтрансферный центр, AcPhe — *N*-ацетил [^{14}C]-фенилаланин, СрСрА — цитидил (5'→3')цитидил (5'→3')аденозин, D-TA и L-TA — соответственно *D*-(-)- и *L*-(+)-трео-1(*n*-нитрофенил)-2-аминопропандиол-1,3.

руемого рибосомой переноса пептида на такую молекулу. Для проверки этой гипотезы был синтезирован ряд аминокислотных аналогов хлорамфеникола (II), в которых дихлорацетильный остаток замещен на некоторые аминокислоты (глицин, *L*-лейцин, *L*-фенилаланин, *O*-метил-*L*-тирозин) [7, 8]. Все эти соединения (II) ингибировали синтез полифенилаланина, полилизина и полипролина на искусственных матрицах.



Однако перенос пептидов на аналоги хлорамфеникола получить не удалось [8]. Можно предположить, что если в системах образования пептидной связи результаты анализа продуктов реакции будут более однозначными, акцептирование пептида аналогами типа II можно будет обнаружить легче. Неоднозначность исследованных ранее систем [7, 8] подтверждается, например, тем, что в работе [9] в условиях синтеза тех же полипептидов также с рибосомами *E. coli* для *L*- и *D*-фенилаланиновых, *L*-метионинового и глицинового аналогов типа (II) никакого ингибирующего эффекта вообще не было найдено. Кроме того, показано, что пептидакцепторная активность разных аминокислотных эфиров аденозина в различных бесклеточных системах с рибосомами *E. coli* очень сильно варьирует [10].

В статье сообщается о результатах испытаний глицинового и фенилаланинового амидов *D*-ТА (II) и *L*-ТА (III), а также *N,O*³-ди-*L*-фенилаланил-*D*-ТА (IV) и *O*³-*L*-фенилаланилхлорамфеникола (V). Исследование проведено в трех бесклеточных системах с рибосомами *E. coli*: ингибирование переноса остатка AcPhe из AcPhe-tРНК на пурамицин в присутствии поли(V) и в безматричной системе с 33% этанола по методу [11], а также ингибирование синтеза полифенилаланина на матрице поли(V) аналогично работам [7-9].



В табл. 1 и на рис. 1 показан ингибирующий эффект амидов II и III на катализируемую рибосомами реакцию переноса AcPhe- из AcPhe-tРНК на пурамицин в системе с поли(V). Наиболее мощным ингибирующим эффектом в этой системе обладал Gly-*D*-ТА (II, R=H), причем его активность была близкой к активности хлорамфеникола. Phe-*D*-ТА (II, R=CH₂C₆H₅) также довольно эффективно ингибировал образование AcPhe-пурамицина, тогда как амиды *L*-ряда (III) и исходный *D*-ТА на процесс почти не влияли.

Образование AcPhe-пурамицина могло ингибироваться (II) по механизму, который известен для природного хлорамфеникола. В этом случае

Ингибирование соединениями II—III реакции AcPhe-тРНК с пурамицином в присутствии поли (U) (тестируется количество образовавшегося AcPhe-пурамицина)

Концентрация ингибитора, М	Хлорамфеникол (I)		Gly-D-ТА (II, R=H)		Phe-D-ТА (II, R=CH ₂ C ₆ H ₅)		Phe-L-ТА (III, R=CH ₂ C ₆ H ₅)	
	AcPhe-пурамицин, пмоль	ингибирование, %	AcPhe-пурамицин, пмоль	ингибирование, %	AcPhe-пурамицин, пмоль	ингибирование, %	AcPhe-пурамицин, пмоль	ингибирование, %
1·10 ⁻³	3,20	0	3,70	0	5,54	0	5,54	0
5·10 ⁻⁴	—	—	—	—	0,22	96,2	4,31	22,0
3·10 ⁻⁴	—	—	0,04	99,0	0,65	88,3	4,41	20,4
3·10 ⁻⁴	0,11	96,6	0,21	94,4	1,54	72,3	4,49	19,1
1·10 ⁻⁴	0,22	93,8	0,40	89,0	2,86	48,5	4,78	13,6
3·10 ⁻⁵	0,45	86,0	1,15	69,0	4,04	27,0	4,81	13,1
1·10 ⁻⁵	1,15	64,2	1,96	47,0	—	—	4,95	10,7
3·10 ⁻⁶	1,96	38,8	2,98	19,5	—	—	—	—
1·10 ⁻⁶	2,60	18,8	3,70	0	—	—	—	—

рибосома не катализирует реакции переноса AcPhe-остатка на какой-либо акцептор. В другом случае можно было представить катализируемое рибосомами образование AcPhe-II. Образовавшееся соединение могло не покидать рибосому, вследствие чего не экстрагироваться этилацетатом и создавать внешнее впечатление отсутствия реакции. Прямая экстракция инкубационной смеси, содержащей комплекс AcPhe-тТНК·рибосома·поли(U) с (II), но без пурамицина (табл. 2), не выявила образования

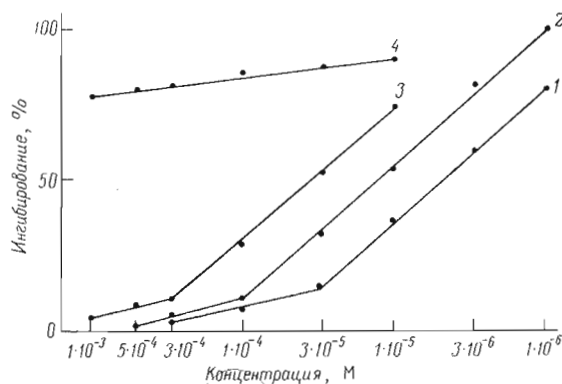


Рис. 1. Зависимость ингибирования соединениями (II), (III) реакции AcPhe-тРНК с пурамицином в рибосомах в присутствии поли(U) от концентрации II—III; 1 — хлорамфеникол (I); 2 — Gly-D-ТА (II, R=H); 3 — Phe-D-ТА (II, R=CH₂C₆H₅); 4 — Phe-L-ТА (III, R=CH₂C₆H₅)

AcPhe-II. Следует отметить, что специально синтезированные из оксисукцинимидного эфира ацетилфенилаланина и II AcPhe-II хорошо экстрагировались из инкубационных масс контрольных опытов в этилацетат. Поэтому во второй серии испытаний проводили диссоциацию субъединиц рибосом после инкубации и последующую экстракцию продуктов реакции этилацетатом аналогично работе [12]. Как видно из табл. 2, никаких растворимых в этилацетате радиоактивно меченых веществ обнаружить не удалось.

Однако можно было предположить, что какое-либо определенное структурное состояние акцепторного участка ПТЦ может вызвать пептидакцеп-

Взаимодействие комплекса рибосома·поли-(U)·AcPhe-тРНК с пурамицином или Phe-D-TA (CH₂C₆H₅) в различных условиях

Условия опыта	Экстрагируемый в этилацетат радиоактивный материал, пмоль			
	пурамицин, ·10 ⁻³ М		Phe-D-TA (II), ·10 ⁻³ М	
	+поли (U)	-поли (U)	+поли (U)	-поли (U)
Полная система *	3,77	0,58	0,37	0,45
+мочевина 0,40 М	4,36	0,58	0,30	0,45
» 0,35 М	5,16	0,58	0,35	0,45
» 0,70 М	4,86	0,58	0,32	0,45
Полная система (K ⁺ 0,05 М)	2,02	0,41	0,54	0,61
+K ⁺ 0,10 М	1,18	0,40	0,57	—
+K ⁺ 0,20 М	0,77	0,31	0,60	—
-K ⁺	0,24	0,30	—	—
Полная система	3,82	0,73	0,13	0,20
+этанол 33%	0,45	—	0,19	—
+мочевина 0,35 М	4,45	—	0,18	—
Полная система **	3,40	1,15	0,18	0,19
+этанол 33%	0,67	—	0,18	—
+мочевина 0,35 М	3,64	—	0,19	—

* Полная система содержала в объеме 0,15 мл: буфер А, 3 ОЕ₂₆₀ рибосом, 1 ОЕ₂₆₀ поли (U), 20-50 мкг Ac-(¹⁴C) Phe-тРНК, 10⁻³ М пурамицина или ингибитора.

** Экстракция в этилацетат проведена после диссоциации рибосом.

торную активность II. Для того чтобы проверить это предположение, изучали ингибирующую активность (II) и параллельно с ней способность (II) акцептировать пептид как в условиях, несколько облегчающих диссоциацию рибосом [13] (увеличение концентрации K⁺ и добавление в инкубационную массу мочевины), так и в условиях, затрудняющих диссоциацию рибосом [14] (добавление спирта). Как видно из табл. 2, ни прямая экстракция этилацетатом инкубационной массы, ни экстракция после диссоциации рибосом не выявила образования AcPhe-II.

В системе без матрицы наиболее сильный ингибирующий эффект также наблюдался для Gly-D-TA (II, R=H), тогда как Gly-L-TA и Phe-L-TA влияли на синтез AcPhe-пурамицина значительно слабее. Пептидакцепторная активность (II) в этой системе также практически не обнаружена.

Вещества (IV) и (V), несущие остаток L-фенилаланина на O³-гидроксиле, также обладают небольшим ингибирующим эффектом. Но в вариантах обработки с диссоциацией рибосом и без диссоциации при различных концентрациях K⁺ ни одно из них не акцептировало пептид (табл. 3).

Есть основания полагать, что аминокислотные аналоги (II) взаимодействуют с рибосомами подобно хлорамфениколу. Это подтверждает конкуренцию их с [¹⁴C]-хлорамфениколом [9]. Суммирование влияния ингибирующих эффектов хлорамфеникола и Gly-D-TA (II, R=H) (в обратных концентрационных координатах) на образование AcPhe-пурамицина (рис. 2), также указывает на конкуренцию (I) и (II) за связывание с одним и тем же участком рибосомы.

Результаты опытов по ингибированию синтеза полифенилаланина в системе с поли(U) для (II) и (III) показали, что амиды D-(—)-треорыда (II) ингибировали процесс слабее в 2-4 раза, чем хлорамфеникол; в то же время вещества L-(+)-треорыда (III) были почти неактивны. Эти данные соответствуют сообщенным ранее [7, 8] и поэтому здесь не обсуждаются.

Отсутствие пептидакцепторной активности (II) не подтверждает гипотезу о структурном и функциональном подобии акцепторного конца аминокил-тРНК (или пуромцина) и хлорамфеникола, однако и не отвергает ее. Столь же косвенно обоснованы выводы о подобии механизма действия

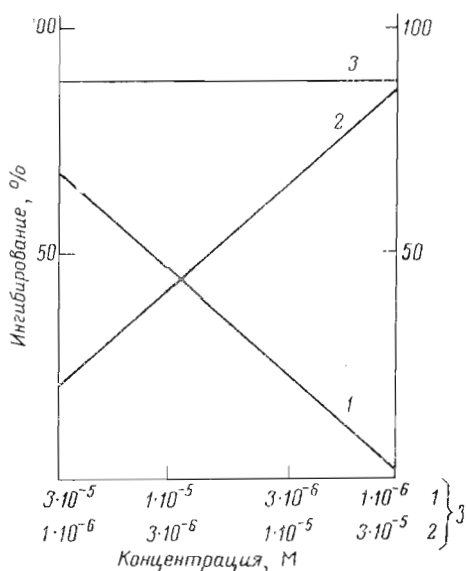


Рис. 2. Ингибирование хлорамфениколом (1), Gly-D-TA (2) и суммарный эффект (3) на реакцию АсРhe-тРНК с пуромцином в рибосомах в присутствии поли(U)

антибиотика гоугеротипа [15–16], 5'-аминокислотных эфиров аденозина [17] и других соединений [см. 17, 18]. В то же время не исключено, что если бы NH_2 -группа в (II) была ориентирована несколько иначе, такие соединения акцептировали бы пептид. Примером могут являться данные об ингибирующей, но не пептидакцепторной активности 2'-фенилаланинового эфира 3'-О-метилдинуклеозидфосфата ($\text{CrA}_{\text{Me}}^{\text{Phe}}$), в отличие от его изомера 3'-О-фенилаланил-2'-О-метилдинуклеозидфосфат ($\text{CrA}_{\text{Phe}}^{\text{Me}}$), который превосходно акцептирует пептид [19]. Это четко показывает, что помимо связывания вещества по акцепторному участку ПТЦ необходимо строгое фиксирование NH_2 -группы в определенном положении.

Одно из синтезированных соединений Phe-D-TA (II, R = $\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$) испытывали на ингибирование роста *E. coli* штаммов 93 и 795 и *Staph. aureus* 209 P и 2-О. Минимальная подавляющая рост концентрация Phe-D-TA во всех случаях была не ниже 1 мг/мл. Ингибирования биосинтеза белка с помощью Phe-D-TA на сферопластах *E. coli* 93 также практически не наблюдали. Следовательно, отсутствие биологической активности Phe-D-TA не связано с непроницаемостью его через клеточные мембраны.

Экспериментальная часть

Материалы и методы. Испытанные в работе соединения были синтезированы нами [20]. Использовали следующие препараты: [^{14}C]-фенилаланин, удельная радиоактивность 220 Ки/моль (фирма «YVVR», Чехословакия), пуромцин (фирма «Serva», Швейцария, или «Reanal», Венгрия), неорганические соли фирмы «Рахим» (СССР) квалификации о.с.ч. Рибосомы *E. coli* MRE-600 выделяли так же, как описано в работе [21]. [^{14}C] Phe-тРНК получали из суммарной или обогащенной по фенилаланиновой фракции до 48% тРНК *E. coli* и [^{14}C] фенилаланина по методу работы [22]. Ас-[^{14}C]Phe-тРНК приготавливали в соответствии с работой [23]. Радиоактивность продуктов, осажденных с помощью трихлоруксусной кислоты, измеряли в толуольном сцинтиляторе на нитроцеллюлозных фильтрах № 3, а этилацетатных экстрактов — в 10 мл толуольного сцинтилятора с добавлением 5 мл метилцеллюлольва и просчитывали на жидкостном сцинтиляционном счетчике SL-30 («Intertechnique», Франция).

Хранение рибосом. Суспензию рибосом разводили буфером (0,05 M трис-HCl pH 7,4; 0,01 M MgCl_2) до концентрации ~5 мг/мл и рибосомы высаливали при 4° С из раствора с помощью $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ из расчета 4 г соли на 100 мл раствора. Осадок рибосом под $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ хранили при 4° С.

Взаимодействие комплекса рибосома-поли (U) · AcPhe-тРНК с пурамицином, (Phe)₂-D-TA (IV) или Phe-хлорамфениколом (V) в различных условиях

Условия опыта	Экстрагируемый в этилацетат радиоактивный материал, пмоль					
	пурамицин		(Phe) ₂ -D-TA (IV)		Phe-хлорамфеникол (V)	
	+поли (U)	-поли (U)	+поли (U)	-поли (U)	+поли (U)	-поли (U)
Полная система						
+ингибитор 1·10 ⁻³ М	4,67	0,93	0,52	0,61	0,55	0,69
» 5·10 ⁻⁴ М			0,53	—	0,59	—
» 2·10 ⁻⁴ М			0,50	—	—	—
Полная система						
+ингибитор (·10 ⁻³ М)						
+K ⁺ 0,05 М	5,20	1,21	0,60	0,57	0,54	0,61
+K ⁺ 0,10 М			0,58	—	0,57	—
+K ⁺ 0,20 М			0,62	—	0,60	—
Полная система						
+ингибитор (·10 ⁻³ М)						
до диссоциации	4,63	0,75	0,29	0,44	0,30	0,42
после диссоциации			0,67	—	—	—

Ингибирование амидами (II) — (III) реакции AcPhe-тРНК с пурамицином в присутствии поли(U). Реакционная смесь содержала в объеме 0,15 мл: 0,05 М трис-НСl (рН 7,5), 0,01 М MgCl₂, 0,05 М KCl, рибосомы (30E₂₆₀), поли(U) (10E₂₆₀), 20–50 мкг Ac-[¹⁴C]Phe-тРНК. Инкубацию проводили при 30° в течение 20 мин, к образовавшемуся комплексу добавляли либо 0,001 М пурамицина (контрольный опыт), либо исследуемый ингибитор, 0,001 М пурамицина и инкубировали при 30° С еще 30 мин. К смеси приливали 0,15 мл 0,5 н. NaOH, оставляли на 2 ч при 4°, затем вносили 0,7 мл холодного буфера 0,05 М трис-НСl (рН 7,0), 0,001 М ЭДТА и 3 мл этилацетата. После экстракции органический слой отделяли, высушивали Na₂SO₄ и в аликвоте 2 мл определяли радиоактивность.

Опыты по исследованию пептидацепторной активности II проводили аналогично, только в инкубационную среду не вносили пурамицин. Соединения (IV) и (V) исследовали без щелочного гидролиза.

Диссоциация рибосом. Инкубацию проводили, как указано выше, затем реакцию останавливали добавлением 2 мл холодного буфера 0,05 М трис-НСl (рН 7,0), 0,001 М ЭДТА, пробы оставляли на 5–8 ч при 4° С и затем вносили 0,2 мл 40% NaOH. Гидролиз проводили 2 ч при 20° С, к реакционной смеси прибавляли 5 мл этилацетата, после экстракции органический слой отделяли, высушивали Na₂SO₄ и в аликвоте просчитывали радиоактивность.

Ингибирование амидами II–III реакции AcPhe-тРНК с пурамицином в условиях без матрицы. Инкубационная смесь содержала в объеме 0,3 мл: Ac-[¹⁴C]Phe-тРНК 20–50 мкг, рибосомы 3 0E₂₆₀, 0,057 М трис-НСl (рН 7,6), 0,4 М KCl, 0,02 М MgCl₂, 0,001 М пурамицини. Реакцию начинали прибавлением этилового спирта до конечной концентрации 33%, инкубировали 4 ч при 24° С, вносили 0,3 мл 1 н. NaOH, оставляли на 2 ч при той же температуре для гидролиза неспецифических продуктов реакции и далее обрабатывали подобно опыту с матрицей.

Авторы благодарят С. В. Поповкину и С. Г. Завгороднего за синтез аналогов хлорамфеникола, а также И. П. Фомину и Ю. О. Сазыкина (Все-союзный НИИ Антибиотиков) за проведение микробиологических испытаний.

ЛИТЕРАТУРА

1. Pestka S. (1971) *Annual Rev. Microbiol.*, **25**, 487-562.
2. Lessard J. L., Pestka S. (1972) *J. Biol. Chem.*, **247**, 6909-6912.
3. Pongs A., Bald R., Erdman V. A. (1973) *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, **70**, 2229-2233.
4. Nierhaus G., Nierhaus K. H. (1973) *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, **70**, 2224-2228.
5. Leick V., Vortin I., Cooperman S., Rich A. (1973) 9 FEBS Meeting, 3n4, 191.
6. Nierhaus K. H., Montejo V. (1973) *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, **70**, 1931-1935.
7. Coutsogeorgopoulos C. (1966) *Biochim. et biophys. acta*, **129**, 214-217.
8. Coutsogeorgopoulos C. (1967) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **27**, 46-52.
9. Ringrose P. S., Lambert R. W. (1973) *Biochim. et biophys. acta*, **299**, 374-384.
10. Rychlik I., Černa J., Chládek S., Pulkrábek P., Zemlička J. (1970) *Eur. J. Biochem.*, **15**, 136-142.
11. Monro R. E., Černa J., Marker K. A. (1969) *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, **61**, 1042-1046.
12. Gottikh B. P., Kravetsky A. A., Kukhanova M. K., Jatsyna A. A., Kritzyn A. M., Florentiev V. L. (1973) *Mol. Biol. Reports*, **1**, 173-178.
13. Spirin A. S., Sabo B., Kovalenko V. A. (1971) *FEBS Lett.*, **15**, 197-200.
14. Petermann M. L., Pavlovec A., Hamilton M. G. (1972) *Biochemistry*, **11**, 3925-3932.
15. Černa J., Lichtenthaler F. W., Rychlik I. (1971) *FEBS Lett.*, **14**, 45-49.
16. Lichtenthaler F. W., Trummlitz G. (1974) *FEBS Lett.*, **38**, 237-242.
17. Robins M. J., Simon L. N., Stout M. G., Ivanovics G. A., Schueizer M. P., Rousseau R. G., Robins R. K. (1971) *J. Amer. Chem. Soc.*, **93**, 1474-1483.
18. Harris R. J., Symons R. H. (1973) *Bioorganic Chemistry*, **2**, 266-285.
19. Ringer D., Chládek S. (1974) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **56**, 760-766.
20. Поповкина С. В., Турция К. Ф., Завгородний С. Г., Краевский А. А., Куханова М. К., Орлов В. М., Гнучев Н. В., Готтих Б. П. (1975). *Биоорганич. химия*, **1**, 359-367.
21. Lessard J. L., Pestka S. (1972) *J. Biol. Chem.*, **247**, 6901-6908.
22. Lewin J. C., Nirenberg M. (1968) *J. Mol. Biol.*, **34**, 467-478.
23. Lapidot Y., de Groot N., Fry-Shafir I. (1968) *Biochim. et biophys. acta*, **145**, 292-304.

Поступила в редакцию
26.VII.1974

AMINO ACID ANALOGS OF CHLORAMPHENICOL AS INHIBITORS OF PEPTIDYL TRANSFER REACTION IN *E. COLI* RIBOSOMES

A. A. KRAYEVSKY, L. V. NIKOLAYEVA, M. K. KUKHANOVA,
N. V. GNUCHEV, B. P. GOTTIKH

*Institute of Molecular Biology, Academy of Sciences
of the USSR, Moscow*

The effect of amino acid analogs of antibiotic chloramphenicol on the formation of peptide bond by *E. coli* MRE-600 peptidyl transferase was studied and compared with the effect of chloramphenicol itself. The formation of a peptide bond was studied in simple ribosomal systems in which AcPhe-tRNA served as a donor and puromycin as an acceptor. The transfer of AcPhe was inhibited by glycine and L-phenylalanine amides of *D*-(-)-threo 1-(*p*-nitrophenyl)-2-aminopropanediol-1,3; the respective amides of *L*-(+)-threo series proved practically inactive. However, none of the compounds investigated accepted peptide under a wide range of experimental conditions (presence of various K⁺ concentrations, adding of ethanol and urea as well as under conditions when ribosomes were dissociated into subunits after incubation).